PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C07C 401/00

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 99/67211

A1 |

DE

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

29. Dezember 1999 (29.12.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP99/04418

(22) Internationales Anmeldedatum:

25. Juni 1999 (25.06.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 28 379.2 198 40 435.2 25. Juni 1998 (25.06.98)

4. September 1998 (04.09.98) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): IM-MUNDIAGNOSTIK GESELLSCHAFT FÜR PRODUK-TION UND VERTRIEB VON LABORDIAGNOSTIKA MBH [DE/DE]; Wiesenstrasse 4, D-64625 Bensheim (DE). BIOMEDICA GMBH [AT/AT]; Divischgasse 4, A-1210 Wien (AT).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ARMBRUSTER, Franz, Paul [DE/DE]; Mittelstrasse 24, D-67240 Bobenheim-Roxheim (DE). VOELTER, Wolfgang [DE/DE]; Panoramastrasse 71, D-72070 Tübingen (DE). SCHWING, Jens [DE/DE]; St. Georg Strasse 1, D-55128 Mainz (DE). BIRKMAYER, Christian [DE/DE]; Reitmorstrasse 54, D-80538 München (DE).

(74) Anwälte: BENEDUM, Ulrich, Max usw.; Haseltine Lake Partners, Motorama Haus 502, Rosenheimer Strasse 30, D-81669 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DE (Gebrauchsmuster), DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen

(54) Title: FUNCTIONAL VITAMIN D DERIVATIVES AND A METHOD FOR DETERMINING 25-HYDROXY-VITAMIN D AND 1α,25-DIHYDROXY-VITAMIN D

(54) Bezeichnung: FUNKTIONELLE VITAMIN-D-DERIVATE UND VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON 25-HYDROXY-UND 1α.25-DIHYDROXY-VITAMIN-D

(57) Abstract

The invention relates to a multifunctional vitamin D derivative of formula (I) wherein; O represents the oxygen atom of an ether group; X represents a spacer group having a length of 0.8 to 4.2 nm, for example, an amino carboxylic acid radical, an amino undecanoic acid radical, or an amino polyether radical; Y represents hydrogen or hydroxy; A represents a tracer group such as biotin, digoxygenin or another vitamin D group which are bound by a protein having a higher affinity; R represents a hydrocarbon side-group of vitamin D or vitamin D metabolites. The invention also relates to a method for quantitatively determining a 25-hydroxy-vitamin D metabolite and a 1α ,25-dihydroxy-vitamin D metabolite in a sample.

(57) Zusammenfassung

Multifunktionelles Vitamin-D-Derivat der Formel (I), worin ist: O das Sauerstoffatom einer Ethergruppe; X eine Abstandsgruppe von 0,8 vis 4,2 nm Länge, bspw. ein Aminocarbonsäure-, Aminoundecansäure- oder Aminopolyetherrest; Y Wasserstoff oder Hydroxy; A eine Tracer-Gruppe wie Biotin, Digoxigenin oder eine weitere Vitamin-D-Gruppe, die von einem Protein mit hoher Affinität gebunden werden; R eine Kohlenwasserstoff-Seitengruppe von Vitamin-D bzw. Vitamin-D-Metaboliten; sowie Verfahren zur quantitativen Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1α,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Metabolit in einer Probe.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	1.8	Lesono	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	I T	Litzuen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	Ú.U	Luxemburg	SN	Senegal
ΑU	Australien	GA	Gabun	Ĺ٧	Leitland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Мовасо	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien '	HU	Ungam	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	ΙE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	us	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	00	Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
СН	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ΥU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen	23.11	Zimbabwc
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SĐ	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

WO 99/67211 PCT/EP99/04418

FUNKTIONELLE VITAMIN-D-DERIVATE UND VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON 25-HYDROXY- UND 1α,25-DIHYDROXY-VITAMIN-D

Die Erfindung betrifft Derivate von 25-Hydroxyvitamin-D, deren Herstellung sowie Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D in Proben.

Die D-Vitamine oder Calciferole entstehen aus ihren Provitaminen durch eine Sonnenlicht-katalysierte Spaltung des B-Rings im Sterangerüst. Ihre wichtigsten Vertreter sind Vitamin-D₃ (Cholecalciferol) und Vitamin-D₂ (Ergocalciferol), welche sich nur in den Seitenketten geringfügig unterscheiden, die aber - soweit bekannt - gleich metabolisiert werden und identische biologische Wirkungen besitzen. Während Provitamin-D₂ mit der Nahrung aufgenommen werden muss, kann das Provitamin-D₃ im menschlichen Organismus gebildet werden. Soweit durch Indizes nicht näher bezeichnet, umfasst die Bezeichnung Vitamin-D nachstehend allgemein alle Vitamin-D-Formen. In der Haut gebildetes oder mit der Nahrung aufgenommenes Vitamin-D wird im Plasma vom Vitamin-D-Bindungs- oder -Transportprotein (DBP) gebunden, zur Leber transportiert und dort zu 25-Hydroxyvitamin-D (25-OH-D) metabolisiert. Das Vitamin-D-bindende Protein DBP ist auch als Gc-Globulin oder group specific component bekannt (J.G. Haddad in J. Steroid Biochem. Molec. Biol. (1995) 53, 579-582). Über 95% des im Serum messbaren 25-Hydroxyvitamin-D ist in der Regel 25-Hydroxyvitamin-D₃. 25-Hydroxyvitamin-D₂ wird nur in höheren Anteilen gefunden, wenn die Person unter einer Medikation mit Vitamin-D₂ steht oder, wie in den Vereinigten Staaten häufig praktiziert, die Nahrung mit Vitamin-D₂ angereichert wird.

25-Hydroxyvitamin-D ist der vorherrschende Vitamin-D-Metabolit im Blutkreislauf und seine Konzentration im Serum beschreibt allgemein den Vitamin-D-Status, d.h., inwieweit dem Organismus Vitamin-D zur Verfügung steht. 25-Hydroxyvitamin-D wird bei Bedarf in der Niere zu 1α,25-Dihydroxyvitamin-D metabolisiert, einer hormonartigen Substanz mit hoher biologischer Wirkung. Die Bestimmung von 1α,25-Dihydroxyvitamin-D gibt an, wieviel Vitamin-D sich in der aktivierten Form befinden.

Die Bestimmung von 25-Hydroxyvitamin-D in einer Probe erfolgt bevorzugt nach dem Prinzip der kompetitive Proteinbindungsanalyse, wobei anhand der Verdrängung von radioaktivem 25-Hydroxyvitamin-D von den Bindungsstellen eines Vitamin-D-bindenden Proteins das in der Probe vorhandene 25-Hydroxyvitamin-D quantifiziert wird. Daneben haben sich seit einigen Jahren Radioinmunoassays mit ¹²⁵I-markierten Vitamin-D-Derivaten und Antikörpern gegen Vitamin-D-Derivate in der Diagnostik etabliert. Die Angaben zum üblichen 25-Hydroxyvitamin-D-Spiegel im Serum schwanken je nach Labor. Es besteht aber Einigkeit dahin, dass die Konzentration von 25-Hydroxyvitamin-D im Serum in der Regel größer als 5 ng/ml und kleiner als 80 ng/ml ist. Die kompetitive Proteinbindungsanalyse verlangt den Einsatz eines radioaktiven Vitamin-D-Derivats, welches das gleiche Proteinbindungsverhalten besitzen muss wie 25-Hydroxyvitamin-D. Ähnliches gilt auch für die kompetitive Bindungsanalyse für das biologisch aktive 1α,25-Dihydroxyvitamin-D oder andere Vitamin-D-Metaboliten.

5

10

15

20

25

30

Die europäischen Patentschriften 0 312 360 und 0 363 211 sowie Tanabe et al. in J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1989, 1220-1221 und J. Nutri. Sci. Vitaminol., 1991, 37, 139-147 offenbaren verschiedene ¹²⁵Iod-markierte Hydroxy- und Dihydroxyvitamin-D-Derivate und deren Verwendung in Bindungsanalysen. Nachteilig an diesen Derivaten ist, dass sie problematisch herzustellen und extrem labil sind. Licht, radioaktive Strahlung, Protonen, Wasserstoff, Enzyme, freie Radikale oder die Gegenwart von Iod in freier oder gebundener Form haben großen Einfluss auf die Raumstruktur und die Bindeeigenschaften der Vitamin-D-Derivate an Vitamin-D-bindendes Protein DBP oder spezifischen Antikörpern. Sie können vor allem eine Drehung des A-Rings im Sterangerüst verursachen oder katalysieren. Die 3β-Hydroxygruppe des Vitamin-D-Moleküls wird dabei in die Pseudo-1α-Position gedreht, so dass dann das 5,6-trans-Vitamin-D vorliegt. Die sogenannten Pseudo-1α-Hydroxy-Analogen des Vitamin-D werden zwar ähnlich wie Vitamin-D metabolisiert, sie haben aber eine in wesentlichen Punkten andere Struktur und werden von Vitamin-D-bindenden Proteinen wie bspw. DBP/Gc-Globulin oder Anti-Vitamin-D-Antikörper nicht oder deutlich schlechter gebunden.

15

10

5

20

Die vorstehend beschriebene Umlagerung ist als Beispiel zu verstehen. Es treten auch andere chemische Reaktionen und Umlagerungen auf. Gleiches gilt für ³H- oder ¹⁴C-markierte Vitamin-D-Derivate. Auch diese Vitamin-D-Derivate sind nicht so stabil, dass sie eine zuverlässige Bindungsanalyse erlauben. Die radioaktive Markierung steigert zudem die Kosten für Lagerung, Transport und Entsorgung und ist allgemein nachteilig für Gesundheit und Umwelt. Ferner ist die Halbwertszeit von ¹²⁵Iod vergleichsweise kurz. Eine kompetitive Bindungsanalyse mit ³H- und ¹⁴C-markierten Vitamin-D-Derivaten hingegen verlangt besondere Szintillationszähler und ist apparativ anspruchsvoller, bei weitgehend gleichen Problemen.

oseudo-1a-Hydroxy-Analog

Ray et al. in Biochemistry, 1991, 30, 4809-4813 offenbaren die Kopplung von Vitamin-D₃ mit verschiedenen farbgebenden Gruppen. Die Nachweisempfindlichkeit für die farbstoffmarkierten Vitamin-D₃-Derivate ist aber zu gering, als dass man sie in einer kompetitiven Bindungsanalyse für natürliche Vitamin-D-Metabolite einsetzen könnte, abgesehen davon, dass die farbstoffmarkierten Derivate in Serum nicht stabil und zudem besonders lichtempfindlich sind

Es ist Aufgabe der Erfindung, Vitamin-D-Derivate zur Verfügung zu stellen, die in einer kompetitiven Bindungsanalyse oder ganz generell in Immunoassays von Vitamin-D-Metaboliten wie 25-Hydroxy- und 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D eingesetzt werden können. Dies setzt folgende Eigen-

35

schaften voraus, erstens, dass für die Vitamin-D-Derivate eine Nachweisempfindlichkeit besteht, welche höher ist, beziehungsweise in einem niedrigeren Konzentrationsbereich liegt, als die Konzentration der gesuchten Vitamin-D-Metabolite in den Proben; zweitens, dass die Derivate in Serum, Plasma oder Urin unter üblichen protischen Bedingungen und gegenüber Serumenzymen stabil sind; und schließlich drittens, dass die Derivate über Wochen und Monate hinreichend licht- und lagerstabil sind. Diese Aufgabe wird gelöst durch Vitamin-D-Derivate der Formel

10

20

30

35

5

15 worin ist:

- O das Sauerstoffatom einer Ethergruppe;
- X eine substituierte oder unsubstituierte Kohlenwasserstoffstoffgruppe von 0,8 bis 4,2 nm Länge, bevorzugt ein C8- bis C12-Gruppe, die übliche Heteroatome wie S, O, N oder P aufweisen kann, ganz besonders bevorzugt eine Hexamido-, Octamido- oder Decamido-Amidopropylether-Linkergruppe;
- Y Wasserstoff oder eine Hydroxygruppe;
- A eine funktionelle Gruppe, die von einem bindenden Protein wie einem Antikörper oder Vitamin-D-bindendes Protein DBP mit hoher Affinität gebunden wird;
- R die Seitengruppe eines Vitamin-D-Metabolits, bevorzugt die Seitengruppe von Vitamin-D₂
 oder D₃, besonders bevorzugt die 25-hydroxylierte Seitengruppe von Vitamin-D₂ oder D₃.

Eine hohe Affinität liegt vor, wenn die Dissoziationskonstante (K) zwischen dem bindenden Protein, z.B. dem Antikörper oder DBP, und dem Antigen bzw. der funktionelle Gruppe A größer 10^8 ist. Eine Dissoziationskonstante größer 10^{16} ist für viele Anwendungen vorteilhaft. In einer bevorzugten Ausführungsform ist A ausgewählt aus Biotin, Digoxigenin, Tyrosin, substituiertem Tyrosin, substituierten Aminosäuren, charakteristischen Aminosäure- und Peptidsequenzen, FITC, Proteinen und Proteingruppen wie Protein A und Protein G oder einem weiteren Vitamin-D-Derivat, ganz besonders bevorzugt 25-Hydroxyvitamin-D.

Die Abstandsgruppe X ist bevorzugt ausgewählt aus substituierten und unsubstituierten C-Körpern mit 0,8 bis 4,2 nm, bevorzugt etwa 0,12 nm Länge. Besonders bevorzugt ist eine Aminocarbonsäure, insbesondere eine Aminoundecansäure, peptidische und Ketogruppe oder ein substituierter oder unsubstituierter Aminopolyetherrest mit einer Länge von 0,8 bis 4,2 nm, bevorzugt etwa 0,9 bis 1,5 nm. Dieser Abstand zwischen der Gruppe A und der Bindungs-bzw. Erkennungsstelle für den Vitamin-D-Rest ist erforderlich, dass die bindenden Proteine an die

jeweiligen Bindungsstellen binden können und dabei sich nicht gegenseitig stören. Zu beachten ist, dass beispielsweise für das Vitamin-D-bindende Protein DBP (Gc-Globlin) die 19-Methylengruppe, gegebenenfalls die 1-Hydroxygruppe des A-Rings und die Vitamin-D-Seitenkette zur Erkennungsstelle gehören und in einer Bindungstasche aufgenommen werden. Ähnliches gilt auch für spezifische Antikörper gegen die verschiedenen Vitamin-D-Derivate. Ist die Abstandsgruppe X zu kurz, kann neben dem Vitamin-D-bindenden Protein kein weiteres Bindungsprotein an der gewählten funktionellen Gruppe A binden. Für das bevorzugte Beispiel heißt das, wenn sich die funktionelle Biotin-Gruppe innerhalb der Bindungstasche des Vitamin-D-bindenden Proteins befindet, ist sie für das zweite Bindungsprotein, zum Beispiel das Streptavidin, nicht mehr zugänglich. Ist die Abstandsgruppe X hingegen zu lang, können Molekülfaltungen auftreten, welche gleichfalls die gleichzeitig Bindung zweier Bindungspartner behindern.

Daneben besitzt die erfindungsgemäße Abstandsgruppe überraschenderweise einen sterischen Effekt. als sie offenbar eine 180°-Drehung des A-Rings aktiv verhindern hilft. Es wird vermutet, ohne an diese Theorie gebunden zu sein, dass das 3β-Sauerstoffatom der Ethergruppe am A-Rings entsprechend einer natürlichen Hydroxygruppe hydratisiert ist und so einen Angriff auf die 5,6-Doppelbindung verhindert, abgesehen von anderen elektronischen und sterischen Effekten. Ein anderer wichtiger Aspekt ist, dass die erfindungsgemäße Ethergruppe von den im Serum oder Plasma stets vorhandenen Esterasen nicht gespalten werden kann.

Ganz besonders bevorzugt ist 25-Hydroxyvitamin- D_3 -3 β -3'[6-N-(biotinyl)hexamido]amido-propylether der Formel II

25

5

10

15

20

und die 1α-Hydroxy- und Vitamin-D₂-Analogen.

Weiterhin bevorzugt sind Derivate, die als zweite funktionelle Gruppe einen Vitamin-D-Rest enthalten. Der Vorteil dieser Derivate ist, dass sie keine systemfremden Gruppen und Verbindungen enthalten und so eine erhöhte Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit der kompetitiven Bindungsanalyse erlauben, auch weil sich eventuelle Bindungsbesonderheiten aus erster und zweiter Bindung des Vitamin-D-bindenden Proteins bei einer quantitativen Bestimmung kompensieren. Besonders bevorzugt sind Verbindungen der nachstehenden Formel III:

35

10

15

20

25

30

35

worin R, Y und X wie in oben in Formel I definiert sind. Besonders günstig sind dabei symmetrische Vitamin-D-Derivate.

Die erfindungsgemäßen 25-Hydroxy- und $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin-D-Derivate sind überraschend licht-, lager- und serumstabil und erlauben in allen kompetitiven immundiagnostischen Verfahren eine empfindliche, zuverlässige quantitative Bestimmung von Vitamin-D-Metaboliten wie 25-Hydroxy- und $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin-D, beispielsweise für die Routinediagnostik im Human- und Veterinärmedizinbereich sowie in der Forschung.

Erfindungsgemäß wird die Verbindung der Formel I erhalten durch ein Verfahren, umfassend die Schritte: a) Cyanoethylierung der 3-Hydroxygruppe von Vitamin-D oder 25-Hydroxyvitamin-D mit Acrylnitril in einem geeigneten Lösungsmittel wie Acetonitril in Gegenwart von Kaliumhydrid und tert.-Butanol; b) Reduktion der resultierenden Nitrilgruppe mit einem Gemisch aus Lithiumhydrid und Lithiumaluminiumhydrid zu einem Amin; und c) Anhängen einer Abstandsgruppe, gegebenenfalls zusammen mit einer funktionellen Gruppe A an das Amin, bspw. Biotinylieren der Verbindung mit einem aktivierten Biotinylierungsreagenz wie LC-BHNS oder, zum Erhalt eines Vitamin-D-Derivats gemäß Formel III, Kopplung von zwei Amino-Vitamin-D-Gruppen durch Kondensation mit einer Dicarbonsäure wie Sebacinsäure mittels Carbodiimid.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung funktioneller Vitamin-D-Derivate ergibt höhere Ausbeuten bei kürzeren Reaktionszeiten. Anders als in herkömmlichen Verfahren erfolgt nämlich in Schritt a) die Cyanoethylierung der 3-Hydroxygruppe in Gegenwart von Kaliumhydrid und tert.-Butanol. Dadurch wird erreicht, dass nur an der 3-Hydroxy-Gruppe von Vitamin-D eine Cyanoethylierung erfolgt und die andere Hydroxygruppen des Vitamin-D vor einer Umsetzung geschützt sind. Die Umsetzung erfolgt bei 0 bis 20°C, bevorzugt bei 5 bis 8°C in einem neutralen Lösungsmittel wie Acetonitril.

Bei der nachfolgenden Reduktion wird die Nitrilgruppe des Cyanoethylethers quantitativ in das Amin überführt, welches dann vergleichsweise einfach mit einer anderen funktionellen Gruppe verknüpft werden kann, zum Beispiel durch Umsetzung mit einem handelsüblichen Biotinylierungsreagenz.

Die Erfindung umfasst zudem die Verwendung der erfindungsgemäßen funktionellen Vitamin-D-Derivate in Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1α,25-Dihydroxy-Vitamin-D in Serum, Plasma, Urin oder einer anderen Probe. Hierbei wird das erfindungsgemäße funktionelle Vitamin-D-Konjugat entweder als Zwischenglied eingesetzt, wobei das Vitamin-D-bindende Protein und nativer Vitamin-D-Metabolit um die Bindestelle kompetitieren, oder selbst als kompetitive Bindungskomponente zu nativem Vitamin-D. Das quantitative Bestimmungsverfahren ist vorzugsweise ein EIA, ELISA, RIA, IRMA, LiA oder ILMA, FIA oder IFMA in manuell abzuarbeitenden Testsystemen oder auf Automaten angepasste Versionen in Flüssigphasen- wie Festphasentechnik.

Ein besonders bevorzugtes Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy-und 1α,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Derivaten umfasst die Schritte: a) Beschichten eines Trägers mit Strep-

10

15

20

25

30

35

tavidin, b) Zugabe ein oder mehrerer multifunktioneller Biotin-Vitamin-D-Derivate. c) Zugabe der Probe und einer definierten Menge Vitamin-D-bindendes Protein, d) Bestimmung des gebundenen Bindungsproteins mit markierten anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-Antikörpern. Die Markierung der anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-Antikörper kann direkt sein, bspw. eine radioaktive Markierung, oder auch indirekt, bspw. ein Enzym oder ein aktives Enzymfragment wie Peroxidase, das eine Farbreaktion zu katalysieren vermag.

Ein weiteres bevorzugtes Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy-und 1α,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Derivaten umfasst die Schritte: a) Beschichten eines Trägers mit anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-Antikörpern, b) Zugabe des Vitamin-D-Bindungsproteins, c) Zugabe der Probe sowie eine definierte Menge Biotin-Vitamin-D-Derivat, d) Bestimmung der Menge gebundenes Derivat mit markiertem Streptavidin. Das Streptavidin ist bevorzugt indirekt mit Peroxidase markiert; der Träger ist vorzugsweise eine Reaktionsgefäßwand, beispielsweise von einer Mikrotiterplatte, oder Teilchen aus polymerem oder magnetischem Material oder beidem, beispielsweise Kunststoff- oder Cellulose-Mikropartikel.

Diese Verfahren ermöglichen eine nicht-radioaktive quantitative Bestimmungen von 25-Hydroxy- und 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D, ohne dass aufwendige Sicherheitsvorkehrungen erforderlich sind. Die hier vorgeschlagenen kompetitiven Verfahren sind somit für Routineuntersuchungen im Rahmen einer Osteoporose-Prophylaxe, bei einer vermuteten D-Hypovitaminose oder D-Hypervitaminose, zur Diagnostik allgemeiner Art und in der Forschung.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Kit zur Bestimmung von Vitamin-D-Metaboliten wie 25-Hydroxy- und 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D, der unter anderem das erfindungsgemäße funktionelle Vitamin-D-Derivat enthält. Der Kit umfasst wahlfrei Vitamin-D-Bindungsprotein (Gc-Globulin), anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-Antikörper, Streptavidin und vorbehandelte oder unvorbehandelte Mikrotiterplatten und/oder magnetische oder andere Mikropartikel und andere Reagenzien.

Weitere Vorteile, Merkmale und Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus den nachstehenden Beispielen und den beiliegenden Zeichnungen. Es zeigt:

- Fig. 1 den schematischen Syntheseweg für das bifunktionelle Vitamin-D-Derivat 25-Hydroxy Vitamin-D₃-3β-3'[6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether) gemäß der Erfindung;
- Figs. 2, 3 und 4 Schemadarstellungen verschiedener ELISAs zur Bestimmung von 25-OH-Vitamin-D mit Hilfe des erfindungsgemäßen 25-OH-Vitamin-D-Konjugat;
- Fig. 5A die Eichkurve eines kompetitiven ELISAs für 25-OH-Vitamin-D nach Fig. 2;
- Fig. 5B Eichkurven von ELISAs gemäß Fig. 5A mit 3, 60 und 100 Tage altem 25-OH-Vitamin-D-Biotin-Tracer;
- Fig. 5C die Eichkurve eines kompetitiven ELISAs für 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D analog Fig. 2;
- Figs. 6 und 7 Schemadarstellungen kompetitiver RIA für 25-OH-Vitamin-D mit Hilfe des erfindungsgemäßen 25-OH-Vitamin-D-Konjugats;

20

25

30

35

Figs. 8, 9 und 10 Schemadarstellungen kompetitiver, radioaktiver IRMAs für 25-OH-Vitamin-D mit Hilfe des erfindungsgemäßen 25-OH-Vitamin-D-Konjugats;

- Figs. 11 und 12 Schemadarstellungen kompetitiver ELISAs unter Verwendung von Mikropartikeln;
- Fig. 13 Schemadarstellung eines kompetitiven Bindungsassays für 25-OH-Vitamin-D mit Hilfe eines 25-OH-Vitamin-D-Konjugats gemäß der Erfindung und einem direktmarkierten Vitamin-D-bindenden Protein.
- Fig. 14 ein Blockdiagramm des Vergleichs der 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Gehalte in Seren von Dialyse- und Normalpatienten.

Fig. 1 zeigt den erfindungsgemäßen Syntheseweg zur Herstellung des bifunktionellen 25-OH-Vitamin-D-Konjugats. Zunächst wird 25-OH-Vitamin-D in einem Gemisch aus Acetonitril, Kaliumhydrid und tert.-Butanol mit Acrylnitril cyanoethyliert. Durch die Gegenwart des als Base fungierenden Kaliumhydrids und durch die Anwesenheit von tert.-Butanol zur Abwendung unspezifischer Reaktionen an der 25-Hydroxygruppe wird erreicht, dass selektiv die 3-Hydroxy-Gruppe des Vitamin-D cyanoethyliert wird. Die Ausbeute an 25-OH-Vitamin-D-3β-cyanoethylether beträgt in der Regel etwa 74% bei einer Reaktionsdauer von 40 Minuten.

Nach üblicher Aufarbeitung wird der 25-OH-Vitamin-D-3β-cyanoethylether mit Lithium-hydrid versetzt und die 25-Hydroxygruppe in das Lithiumalkoholat überführt. Es folgt eine Reduktion des Nitrils mit LiAlH₄ zu 25-OH-Vitamin-D-3β-3'-aminopropylether. Dieser Schritt ist quantitativ, ohne dass Nebenprodukte auftreten. Zuletzt erfolgt gegebenenfalls eine Biotinylierung mit einem aktivierten Biotinylierungsreagenz wie LC-BHNS (Biotinyl-N-ε-aminocaproyl-hydroxy-succinimidester). Die resultierende Abstandsgruppe X hat entsprechend der Aminocaproylkette eine Länge von etwa 0.8 bis 0.9 nm.

25-OH-Vitamin-D-3β-3'[6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether ist temperaturstabil und kann in einer wässrigen, leicht sauren Matrix über mehrere Monate gelagert werden. Da die Verbindung von Serumenzymen nicht gespalten wird, eignet sie sich bestens für diagnostische Routinetests in Serum, Plasma und Urin.

Fig. 2 zeigt eine Schemadarstellung eines kompetitiven ELISA für 25-OH-Vitamin-D. Hierbei wird das 25-OH-Vitamin-D-Konjugat (25-OH-Vitamin-D-3β-3'[6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether) über Streptavidin an eine feste Phase gebunden. Dann erfolgt in flüssiger Phase die kompetitive Bindung von Vitamin-D-bindenden Protein und 25-OH-Vitamin-D aus Standard oder Probe an das 25-OH-Vitamin-D-Konjugat. Der Nachweis erfolgt durch Peroxidase-markierte Antikörper gegen das Vitamin-D-bindende Protein. Der Fachmann weiß, dass auch andere Markerenzyme verwendet werden können, zum Beispiel alkalische Phosphatase oder Galaktosidase, etc.

Fig. 3 zeigt die Schemadarstellung eines kompetitiven, nicht-radioaktiven ELISA, wobei das Vitamin-D-bindende Protein zunächst über anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-Antikörper an die feste Phase gebunden wird. Danach erfolgt in flüssiger Phase die kompetitive Bindung von 25-OH-Vitamin-D-Biotin und 25-OH-Vitamin-D aus Standard bzw. Probe. Zur Bestimmung wird dann

10

15

20

25

30

35

Peroxidase-markiertes Streptavidin eingesetzt. Das gezeigte Prinzip lässt sich selbstverständlich auf andere Tracer-Gruppen statt Biotin und auf andere Markerenzyme, wie oben angegeben, übertragen.

Fig. 4 zeigt die Schemadarstellung eines kompetitiven ELISA, wobei das Vitamin-D-bindende Protein direkt an die feste Phase gebunden ist. Die kompetitive Bindung von 25-OH-Vitamin-D₃-Biotin und 25-OH-Vitamin-D₃ aus Standard bzw. Probe erfolgt in flüssiger Phase und Peroxidase-markiertes Streptavidin wird zur quantitativen Bestimmung eingesetzt.

Fig. 5A -C zeigen die typische Eichkurven von kompetitiven ELISAs mit 25-OH-bzw 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D₃-Biotin gemäß dem in Fig. 2 gezeigten Prinzip. Die Menge an gebundenem Vitamin-D-Bindungsprotein wurde bestimmt durch eine standardisierte Farbreaktion mit Peroxidase-gekoppelten anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-Antikörpern und Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat. Alternative Substrate wären beispielsweise OPD (1,2-Phenyldiamin x 2 HCl), ABTS und andere. Für die Eichkurve wurden Vitamin-D-Proben mit Konzentrationen von 0, 8, 20, 50, 125 und 312 nMol/l eingesetzt. Die Ordinate zeigt die optische Dichte als Mittelwert von zwei Messungen bei 450 nm; die Abszisse die Konzentration an 25-OH- bzw. 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D in nMol/l.

Fig. 6 zeigt die Schemadarstellung eines kompetitiven Protein-Bindungsversuch (CPBA), wobei 25-OH-Vitamin-D₃-Biotin und 25-OH-Vitamin-D aus Standard bzw. Probe in flüssiger Phase um die Bindungsstelle des Vitamin-D-Bindungsproteins kompetitieren. Es wird ¹²⁵I-markiertes Streptavidin für die quantitative Bestimmung verwendet.

Fig. 7 zeigt die Schemadarstellung eines kompetitiven Radioimmunoassays (RIA), wobei 25-OH-Vitamin-D-Biotin und 25-OH-Vitamin-D aus Standard bzw. Probe in flüssiger Phase um die Bindungsstelle eines anti-Vitamin-D-Antikörpers kompetitieren. Für die quantitative Bestimmung wird ¹²⁵I-markiertes Streptavidin eingesetzt. Erfolgt die Bestimmung durch ein Streptavidin, das nicht radioaktiv, sondern mit einem Fluorophor oder Luminophor markiert ist, liegen sogenannte LIA- oder FIA-Assays vor.

Fig. 8 zeigt die Schemadarstellung eines 25-OH-Vitamin-D-IRMA. Es wird zunächst 25-OH-Vitamin-D-Biotin über Streptavidin an die feste Phase gebunden. Die kompetitive Bindung von Vitamin-D-Bindungsprotein an das Konjugat und 25-OH-Vitamin-D₃ aus Standard oder Probe erfolgt dann in flüssiger Phase. Die Menge des Konjugat-gebundenen Bindungsproteins wird mit ¹²⁵I-markierten Antikörpern bestimmt.

Fig. 9 ist die Schemadarstellung einer IRMA-Sandwich-Technik (Immunoradiometrischer Assay). Hierzu werden anti-Vitamin-D₃-Antikörper an die feste Phase gekoppelt. An diese binden dann Vitamin-D-Bindungsproteine. Die Kompetition erfolgt im nächsten Schritt zwischen dem 25-OH-Vitamin-D-Konjugat und 25-OH-Vitamin-D aus Standard oder Probe. Die Bestimmung der Menge gebundenes Konjugat erfolgt durch ¹²⁵l-markiertes Streptavidin.

Fig. 10 zeigt die Schemadarstellung eines weiteren IRMA-Sandwich-Technik. Es wird zunächst Vitamin-D₃-Bindungsprotein an die feste Phase gekoppelt. Dann erfolgt daran die kompetitive Bindung zwischen dem 25-OH-Vitamin-D₃-Konjugat und 25-OH-Vitamin-D₃ aus

10

15

20

25

30

35

Standard oder Probe. Die Menge gebundenes Konjugat wird durch ¹²⁵l-markiertes Streptavidin bestimmt.

Fig. 11 zeigt die Schemadarstellung eines kompetitiven ELISA unter Verwendung von Mikropartikeln. Hierbei wird 25-OH-Vitamin-D-Biotin über Streptavidin an Mikropartikel gebunden. Dann wird 25-OH-Vitamin-D-Derivat daran gebunden. In flüssiger Phase wird Vitamin-D-Bindungsprotein und die jeweilige Probe zugegeben. Bindungsproteine und 25-OH-Vitamin-D₃ aus Standard oder Probe kompetitieren um die Bindungsstelle des Konjugats. Die gebundenen Bestandteile werden dadurch abgetrennt, dass sie über die Mikropartikel von einem Magneten zurückgehalten werden, während der Überstand mit den ungebundenen Substanzen entfernt wird. Die Menge gekoppeltes Bindungsprotein wird bestimmt in einem zweistufigen Verfahren mit einem primären Antikörper gegen Vitamin-D-Bindungsprotein und einem sekundären Peroxidasemarkierten Antikörper.

Fig. 12 zeigt eine Schemadarstellung eines kompetitiven ELISA unter Verwendung von Mikropartikeln. Es wird 25-OH-Vitamin-D-Biotin über Streptavidin an Mikropartikel gebunden. Dann wird die flüssige Probe mit 25-OH-Vitamin-D₃ (aus Standard oder Probe) dazugegeben sowie eine nicht-sättigende Menge Antikörper. Das Konjugat und das native Vitamin-D₃ kompetitieren um die Bindung des Antikörpers. Die Menge gebundener Antikörper erfolgt durch Agglutination der Mikropartikel. Diese kann beispielsweise direkt durch Nephelometrie bzw. Turbimetrie bestimmt werden.

Fig. 13 zeigt das Schema eines kompetitiven Bindungsassays, wobei das Vitamin-D-bindende Protein direkt markiert ist, beispielsweise radioaktiv mit ¹²⁵lod, oder für eine Elektrochemolumineszenz mit Ruthenium(II)tris-(bipyridin)-NHS-ester. Die Markierung können auch Enzyme sein wie Peroxidase, alkalische Phosphatase, β-Galactosidase u.a., oder auch FITC.

Fig. 14 veranschaulicht in einem Blockdiagramm die unterschiedlichen 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Gehalte im Serum von Dialyse- und Normalpatienten.

Die bekannten Bestimmungsverfahren für Proteine wie der kompetitive ELISA beruhen auf dem Prinzip, dass die nachzuweisende Verbindung mit einem Bindungsprotein oder Konjugat um eine Bindungsstelle kompetitiert. Es wird dann die Menge gebundenes Bindungsprotein oder Konjugat bestimmt und anhand einer Eichkurve die Konzentration der nachzuweisenden Verbindung ermittelt.

Die in den Figuren gezeigten Testprinzipien lassen sich einfach auf andere Vitamin-D-Derivate übertragen. Besonders erwähnt sei $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin- D_2/D_3 . In diesem Fall muss ein Bindungsprotein bzw. ein Rezeptor oder Antikörper gewählt werden, der das $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin-D-Analoge spezifisch erkennt. Das zugehörige bifunktionelle $1\alpha,25$ -Dihydroxyderivat kann gewonnen werden enzymatisch durch Umsetzung von 25-OH-Vitamin-D-3 β -cyanoethylether mit 25-OH-Vitamin-D- 1α -Hydroxylase, Reduktion zum Amin und schließlich Addition der zweiten funktionellen Gruppe. Ferner werden hier Derivate von Vitamin- D_2 und Vitamin- D_3 vorgeschlagen. Deren Synthese kann auf dem in Beispiel 1 vorgestellten Weg erfolgen

BEISPIELE

Beispiel 1: Synthese von 25-OH-Vit.-D₃-3β-3'[6-N-(biotinvl)hexamido]amidopropylether (4)

Alle Umsetzungen erfolgten im Dunkeln unter trockener Stickstoffatmosphäre. Zwischenprodukte wurden bei -20°C gelagert. Es wurden HPLC-reine Lösungsmittel eingesetzt. Das 25-OHVitamin-D₃ war von BIOMOL Feinchemikalien GmbH, Hamburg, der LC-BHNS (Long-Chain-Biotinyl-N-e-aminocaproyl-hydroxysuccinimidester) von Sigma Chemie, alle weiteren Chemikalien
von Fluka, Darmstadt. Die Massenspektroskopie(FAB) erfolgte mit einem Finigan-MAT-90, die
NMR-Messungen mit einem Bruker-ARX-400 (400 MHz) oder einem Bruker-ARC-250F (250
MHz).

(i) 25-OH-Vitamin- D_3 - 3β -cyanoethylether (2)

5 mg 25-OH-Vitamin-D₃ (12,5 μMol), gelöst in Methylenchlorid (CH₂Cl₂), wurde in einen mit Stickstoff gefüllten Kolben überführt und das Lösungsmittel abgezogen. Der feste Rückstand wurde in 1 ml Acetonitril aufgenommen und versetzt mit 10 Tropfen einer Mischung von tert.-Butanol und Acetonitril (9:1 v/v) sowie 130 μMol Acrylnitril (10 eq.) in 100 μl Acetonitril [Stammlösung: 86 μl Acrylnitril (1.3 mMol) verdünnt mit Acetonitril auf 1 ml]. Die klare Lösung wurde 15 Minuten bei 6°C gerührt. Es wurde 6.25 μMol Kaliumhydrid (0,5 eq.) in 25 μl tert.-Butanol/Acetonitril (9:1 v/v) [Stammlösung: 10 mg KH (250 μMol) in 1 ml tert.-Butanol/Acetonitril (9:1 v/v)] zugegeben. Die dabei entstehende Ausflockung löste sich sofort wieder. Die Mischung wurde bei 6°C gerührt. Die wiederholte Dünnschichtchromatographie (DC) einzelner Proben mit 20% Petrolether in Methyl-tert.-butylether (MTBE) auf Kieselgel zeigte, dass nach 10 Minuten bereits 90% der Ausgangsverbindung umgesetzt waren. Nach 15 Minuten wurden wenige Tropfen Reaktionsgemisch mit etwa 5 Tropfen Wasser und 0.5 ml MTBE aufgearbeitet. Die DC der organischen Phase zeigte kein Edukt mehr. Nach 40 Minuten wurde das gesamte Reaktionsgemisch mit Wasser/MTBE aufgearbeitet. Es wurde 4 mg öliges Produkt erhalten.

25

5

10

15

20

IR (NaCl/CH2Cl2):	3422	ОН
	2941, 2872	СН
	2252	Nitril
	1105	Ether

30

35

Die HPLC-Analyse (3% MeOH/CH₂Cl₂) ergab 93% Produkt und 7% Edukt. 4 mg Produkt enthielten somit 3.7 mg (8,2 μMoI) Zielverbindung, was einer Ausbeute von 74% entspricht.

(ii) $25-OH-Vitamin-D_3-3\beta-3' aminopropylether (3)$

3.75 mg (8.3 µMol) Nitril aus (i) wurde in 2 ml Ether gelöst, mit 125 µMol Lithiumhydrid gelöst in 1 ml Ether (Stammlösung: 7 mg frisches feinpulvriges LiH in 7 ml Ether) versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur unter Stickstoff gerührt. Es wurde 169 µMol LiAlH₄ als Aufschlämmung in 1 ml Ether (Stamm: 18 mg frisches feinpulvriges LiAlH₄ in 3 ml Ether) zugegeben. Nach einer weiteren Stunde wurde das Gemisch mit 1 ml konzentriertem KOH, 5 ml H₂O und 4 x 20 ml MTBE aufgearbeitet. Die Dünnschichtchromatographie einer Probe mit 1:1 MTBE/Petrolether

10

auf Kieselgel zeigte nur noch den Ausgangspunkt. Das Diol lag bei R_i 0.27; das Nitril bei R_i 0.4. Die gewonnene Substanz wurde ohne weitere Analyse und Aufreinigung weiterverarbeitet.

(iii) 25-Hydroxyvitamin- D_3 -3 β -3'[6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether (4)

Es wurde 3 mg (6.6 μMol) 25-OH-Vitamin-D₃-3β-aminopropylether (3) aus (ii) in 1 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst. Dann wurde unter Stickstoff 3 mg (6.6 μMol) LC-BNHS und 1 μl (17.5 μMol) Triethylamin zugegeben. Es wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt, das DMF abgezogen und der Rückstand mit 20% Methanol (MeOH) in CH_2Cl_2 vorgereinigt. 12 mg (> 100%) der so gewonnenen Substanz wurden mittels HPLC gereinigt (Bedingungen: Knauer Kromasil-100, 5 μM, 250 x 4 mm, 10% MeOH in CH_2Cl_2 , 1,5 ml/min, OD 265 nm, 7 Minuten). Die Ausbeute betrug 1,2 mg (1,5 μMol). Dies entspricht 12%, bezogen auf das 25-OH-Vitamin-D₃ und 18% bezogen auf die Nitrilverbindung.

Tabelle I

Biotin-25-OH-Vitamin-D ₃							
	Н	Mult	cc [Hz]	Zuordnung			
6,42	1	Dd	5,7	NH (Biotin)			
6,2	1	D	11	6			
6,0	1	D	11	7			
5,85	1	Dd	5,7	NH (Biotin)			
5,55	2	M		3-O-CH ₂ (28)			
5.38	1	S		NH oder OH			
5,05	1	D	2	19			
4,83	1	D	2	19			
4,77	1	S		NH oder OH			
4,51	1	М		HC-NH I Biotin			
4,33	1	М		HC-NH II Biotin			
3,53	1	М		3			
2,53	1	D	10	4			
1,21	6	S		26, 27-CH ₃			
0,93	3	D	6	21-CH ₃			
0,54	3	S		18-CH ₃			

15

20

MS (Finigan MAT 90); (FAB): 797 (MH⁺) vom 5.9.97 und 28.11.97; ¹ H-NMR (Bruker ARX 400) in CDCl₃/TMS bei 400 MHz. Die Analysedaten sind in Tabelle I gezeigt.

Beispiel 2: Stabilität von 25-OH-Vit.-D₃-3β-3'[6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether

Es wurde jeweils 20 mg gereinigte 25-OH-D₃-Biotin-Verbindung (25-OH-Vitamin-D₃-3β-3'[6-N-(biotinyl)-hexamido]amidopropylether) aus Beispiel 1 in ein NMR-Röhrchen gegeben und mit 1 ml Lösungsmittel versetzt. Das Lösungsmittel war eine Mischung aus Deuteriochloroform:Deuteroacetonitril:D₂O im Verhältnis 3:2:1 mit einem pH-Wert zwischen 4 und 5. Die Proben

10

25

30

35

wurden 200 Tage unter nachstehenden Bedingungen gelagert und in regelmäßigen Abständen die NMR-Spektren untersucht.

Probe 1: unter Lichtausschluss bei – 20°C;

Probe 2: unter Lichtausschluss bei +4-6°C:

Probe 3: unter Lichtausschluss bei Umgebungstemperatur;

Probe 4: unter starker Lichteinwirkung (auf der Fensterbank) bei Umgebungstemperatur.

Die Proben 1 und 2 zeigten über die ganzen Zeit keine wesentlichen Veränderungen im NMR-Spektrum. Eine HPLC-Analyse bestätigte, dass die Proben 1 und 2 auch nach 200 Tagen protisches Lösungsmittel intakt waren. Probe 3 zeigte eine minimale Veränderung im NMR-Spektrum nach 100 Tagen. Die HPLC-Analyse ergab, dass mehr als 78% der Verbindung noch intakt war. Probe 4 war nach 2 Monaten abgebaut. Die Stabilitätsuntersuchung zeigt, dass die Verbindung unter Ausschluss von Licht sehr beständig ist, selbst in protischen Lösungsmitteln und ohne Kühlung.

Beispiel 3: 25-Hydroxyvitamin-D-ELISA mit 25-Hydroxyvitamin-D₃-3β-3'[6-N-(biotinyl)-hexamido|amidopropylether

Die Bestimmung erfolgte nach dem in Fig. 2 gezeigten Prinzip. Hierzu musste zunächst 25-OH-Vitamin-D-3β-3'[6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether über Streptavidin an eine feste Phase gebunden werden.

20 (i) Beschichtung einer Mikrotiterplatte mit Streptavidin

In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurde jeweils 100 ng Streptavidin gegeben, gelöst in 200 μl 60 mM NaHCO₃, pH 9,6, und die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Streptavidin-Lösung in den Vertiefungen wurde entfernt und jede Vertiefung fünfmal mit 200 μl Waschpuffer (PBS, pH 7.4 mit 0.05% Tween-20) gewaschen. Dann wurde in jede Vertiefung 250 μl Assaypuffer gegeben. Für den Assaypuffer wurde 5 g Casein in 100 ml 0,1 N NaOH gelöst und mit PBS, pH 7,4 auf 1 L Volumen aufgefüllt. Die Lösung wurde eine Stunde gekocht, das Volumen mit destilliertem Wasser auf einen Liter ergänzt, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und 0,1 g Thimerosal zur Vermeidung von Mikrobenwachstum zugefügt. Die Vertiefungen in der Mikrotiterplatte wurden eine Stunde bei Raumtemperatur mit Assaypuffer inkubiert, dann der Assaypuffer entfernt und jede Vertiefung fünfmal mit je 200 μl Waschpuffer gewaschen.

Bindung von 25-Hydroxyvitamin-D₃-3β-3'[6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether

Es wurde in eine jede Vertiefung 100 μl Biotin-Vitamin-D-Lösung gegeben (10 ng 25-OH-Vitamin-D-3β-3'[6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether in 100 μl Waschpuffer) und eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln und unter Schütteln inkubiert. Dann wurde die Biotin-Vitamin-D-Lösung aus den Vertiefungen entfernt und jede Vertiefung fünfmal mit je 200 μl Waschpuffer gewaschen. Es folgte in flüssiger Phase die kompetitive Bindung von Vitamin-D-bindenden Protein in Gegenwart von 25-OH-Vitamin-D aus Standard oder Probe.

10

15

20

25

30

35

(iii) Probenvorbereitung

Es wurde 50 μl Serum in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 200 μl Ethanol_{abs} (vorgekühlt auf -20°C) durch Vortexen gemischt und 20 Minuten bei -20°C ausgefällt. Die Proben wurden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei maximaler Umdrehung zentrifugiert und die Überstände abgenommen und im ELISA eingesetzt.

Man kann in der Regel davon ausgehen, dass Plasma oder Serumproben bei 4°C etwa 2 Wochen stabil sind. Bei längerer Lagerung müssen sie bis zur Bestimmung tiefgefroren werden. Urinproben müssen vor einer Lagerung mit 1 N NaOH auf einen pH-Wert zwischen 6 und 8 eingestellt werden. Sie können dann bei 4°C etwa 14 Tage aufbewahrt werden; bei längerer Lagerung müssen auch sie bis zur Bestimmung tiefgefroren werden.

(iv) Kompetitive Bindung

Es wurde jeweils 100 µl Vitamin-D-bindendes Protein, isoliert aus Ziegenserum (1:15000 in Assaypuffer mit 3% (w/v) PEG 6000), zusammen mit 10 µl Standard, Kontrolle oder Probe (10 µl Überstand aus der Probenvorbereitung) in die Vertiefungen gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde 24 Stunden bei 4°C im Dunkeln und unter Rütteln inkubiert. Dann wurden die Lösungen aus den Vertiefungen entfernt und die Vertiefungen fünfmal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen.

(v) Bestimmung der kompetitiven Bindung

Es wurde jeweils 100 μl Kaninchen-anti-Vitamin-D-Bindungsprotein (1:10000 verdünnt in Assaypuffer mit 3% (w/v) PEG 6000) in die Vertiefungen gegeben und eine Stunde im Dunkeln und unter Rütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösungen wurden aus den Vertiefungen entfernt und jede Vertiefung fünfmal mit je 200 μl Waschpuffer gewaschen. Die quantitative Bestimmung erfolgte mit 100 μl anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase (1:20 000 verdünnt in Waschpuffer). Es wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden Antikörper-Lösungen abgenommen und eine jede Vertiefung fünfmal mit je 200 μl Waschpuffer gewaschen. Für die Farbreaktion wurden 100 μl Tetramethylbenzidin(TMB)-Substrat-Lösung (gebrauchsfertig von NOVUM Diagnostika GmbH, Dietzenbach, DE) in die Vertiefungen gegeben. Nach 30 Minuten wurde die Farbentwicklung gestoppt durch Zugabe von 50 μl 2 M H₂SO₄ pro Vertiefung. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 450 nm. Die nachstehenden Tabellen II und III zeigen das Pipettierschema für die Mikrotiterplatte sowie die Werte für die optische Dichten.

Als Standard wurden Lösungen von 25-OH-Vitamin-D₃ in Assaypuffer mit folgenden Konzentrationen eingesetzt: 0, 8, 20, 50, 125 und 312 nMol/L (siehe Eichkurve in Fig. 5A). Als Kontrolle bzw. Proben dienten vier Seren von Patienten mit einer D-Hypovitaminose (Proben-Nrn. 24, 203, 963, 965) und sowie vier willkürlich ausgewählte Normalseren (Proben-Nrn. NP 18, NP 25, NP 34, NP 37 - Testreihen 3 und 4). Von den Vitamin-D-Mangelseren wurde zudem die 25-OH-Vitamin-D-Konzentration durch kompetitiven Bindungsassay mit Hilfe von ³H-25-OH-Vitamin-D bestimmt. Als weitere "Kontrolle" dienten vier Lösungen, bei denen die jeweilige Konzentration an 25-OH-Vitamin-D aus anderweitigen Bestimmungen bekannt war, entweder aus den Herstellerangaben oder durch einen kompetitiven Bindungsassay (CBPA) mit ³H-25-OH-Vitamin-D.

Tabelle II

Probenanordnung

Pipettier Schema	Standard nMol / L	Doppelwert von Spalte 1	Serumprobe Nr.	Doppelwert von Spalte 3	Kontrollen	Doppelwert von Spalte 5
Reihe / Spalte	1	2	3	4	5	6
Α	NSB	NSB	24	24	K1 (CBPA)	KI (CBPA)
В	0	0	203	203	K2 (CBPA)	K2 (CBPA)
С	8	8	963	963	K3 (HPLC)	K3 (HPLC)
D	20	20	965	965	K4 (HPLC)	K4 (HPLC)
E	50	50	NP 18	NP 18		
F	125	125	NP 25	NP 25		
G	312	312	NP 34	NP 34		
Н			NP 37	NP 37		

NSB: Nichtspezifischer Bindungspuffer (Assaypuffer ohne Vitamin-D-Bindungsprotein)

Tabelle III

Messwerte nach 30 Minuten Farbentwicklung

10

15

20

5

OD 450 nm	Standard	Doppelwert zu Spalte 1	Serumprobe Nr.	Doppeiwert zu Spalte 3	Kontrollen	Doppeiwert zu Spalte 5
Reihe / Spalte	1	2	3	4	5	6
A			0.947	1.023	1.903	2.300
В	2.256	2.182	0.853	0,910	0.393	0.371
С	1,845	1.861	0.646	0.637	1.674	1.586
D	1.432	1.456	1.429	1.303	0.578	0.634
E	0.625	0.612	0.524	0.547		
F	0.287	0.261	0.454	0.419		
G	0.156	0.176	0.341	0.368		
Н			0.421	0.386		
Bmax	2.801	2.676				

Aus den Mittelwerten der Spalten 1 und 2 und den bekannten Konzentration an 25-OH-Vitamin-D wurde die in Fig. 5A gezeigt Eichkurve erstellt. Die Ordinate zeigt die optische Dichte als Mittelwert der beiden Messungen bei 450 nm; die Abszisse die Konzentration an 25-OH-Vitamin-D in nMol/l. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 zusammengefasst.

Beispiel 4: Vergleichende Bindungsanalyse mit ³H-25-OH-Vitamin-D als kompetitiver Partner

Soweit nicht anders angegeben ist, waren alle Reagenzien Puffer und Materialien gleich wie im vorgenannten Beispiel 3. Als kompetitiver Bindungspartner (Tracer) diente Tritium-markiertes 25-OH-Vitamin-D₃.

Abweichend zu Beispiel 3 wurden die Messproben durch Extraktion (in Einzelwerten) aufgereinigt. Hierzu wurde jeweils 50 µl Probe [nicht-spezifischer Assaypuffer NSB, Standard, Kontrolle, Patientenprobe (Plasma, Serum oder Urin)] in ein 1.5 ml Einmalreaktionsgefäß gegeben, 200 µl Acetonitril hinzugefügt, gemischt, die Gefäßwände freizentrifugiert, und die Mischung 20 bis 30

Minuten bei 4°C inkubiert. Das Gemisch wurde 10 Minuten bei 1700 x g zentrifugiert. Die Bestimmungen erfolgten in Doppelwerten mit den Überständen.

Hierzu wurde 25 μl klarer Überstand in ein Glasröhrchen (oder in ein Spezial-RIA-Gefäß von Sarstedt, Darmstadt) überführt, und 10 μl Tracer (³H-25-OH-D), 300 μl Assaypuffer und 100 μl Vitamin-D-bindendes Protein (nicht in NSB) hinzugeben. Der Röhrcheninhalt wurde gemischt, eine Stunde bei 4°C inkubiert, und zum Entfernen von nicht gebundenem radioaktiven Tracer 100 μl Aktivkohlesuspension (aktivkohlehaltiger Phosphatpuffer mit 0.1% NaN₃) zugegeben. Der Röhrcheninhalt wurde gemischt. 3 bis 5 Minuten bei 4°C inkubiert, und die Aktivkohle durch 10 Minuten Zentrifugieren bei 1700 x g pellettiert. Es wurde dann jeweils 400 μl Überstand in ein Zählgefäß (7 ml) überführt und nach Zugabe von 2 ml Szintillatorflüssigkeit wie Aquasafe™ 300 oder HiSafe™ III die im Überstand befindliche Radioaktivität gezählt (2 Minuten in einem Beta-Counter). Die Messwerte für die Kontrollen nach Erstellung der Eichkurve sind in Tabelle 5 gezeigt.

Der Vergleich mit dem ELISA nach Beispiel 3 zeigt, dass für beide Assayverfahren (ELISA und CBPA) gilt, dass der Normbereich für 25-OH-Vitamin-D im Plasma oder Serum etwa 25 - 125 nmol/l ist. Die Nachweisegrenze dieser Testsysteme wurde festgesetzt als B_0 + 2SD. Sie beträgt etwa 2,5 nmol/l.

Kreuzreaktionen: Zu Aktivkohle behandeltem Serum wurde 25-OH-Vitamin-D₂ (125 nmol/l), 24,25-(OH)₂-Vitamin-D₃ (250 nmol/l) und 1,25-(OH)₂-Vitamin-D₃ (250 nmol/l) zugesetzt. Das 25-OH-Vitamin-D₂ reagierte zu 60%, das 24,25-(OH)₂-Vitamin-D₃ zu 100% kreuz, während das 1,25-(OH)₂-Vitamin-D₃ keine Kreuzreaktivität zeigte. Ähnliche Ergebnisse werden auch für erfindungsgemäße multifunktionelle 25-OH-Vitamin-D-Konjugate gefunden bzw. erwartet.

Reproduzierbarkeit: In Wiederholungsmessungen (n=11) einer 25-Dihydroxy-Vitamin-D₃-haltigen Probe wurden nachstehende Resultate erzielt. Ähnliches gilt auch für Messungen mit Hilfe der multifunktionellen 25-OH-Vitamin-D-Konjugate gemäß der Erfindung:

25

5

10

15

20

Tabelle IV

Intraassayvarianz:

	Anzahi	Mittelwert nmol/l	VK %
Probe 1	32	11.3	12.5
Probe 2	32	318	7.2

Interassayvarianz

	Anzahl	Mittelwert nmol/l	VK %
Probe 1	9	9,9	17
Probe 2	9	310	11

Klinik:

	Anzahl	Mittelwert nmol/l
Normalpersonen	35	54
Patienten mit Schenkelhalsbrüchen	43	9,5

Für die in Beispiel 3 genannten Proben wurden mit den Verfahren nach Beispiel 3 und 4 folgende 25-OH-Vitamin-D-Konzentrationen ermittelt.

5

Tabelle V

Serumproben Nr.	ELISA mit 25-OH-D- Biotin nMol/L	CBPA mit ³ H-25-OH- D nMol/L		Kontrollen	ELISA mit 25-OH-D- Biotin nMol / L	Alternative Bestimmung nMol/L
24	32.9	33.3		Kı	Fehlwert	20 (a)
203	36.8	29.19		K2	76.8	75-125 (a)
963	48.9	38.4		К3	15.0	20-33 (b)
965	21.8	15,8		K4	51.3	72-120 (b)
NP 18	57,0					
NP 25	67.9		(a)	CBPA mit 'H-25-OH-	D	
NP 34	82.4		(b)	Herstellerangabe		
NP 37	72.9		1			

Die von den Herstellern angegeben Werte waren generell höher als die im kompetitiven Bindungsassay ermittelten Konzentrationen. Dies lässt vermuten, dass sich in den überlassenen Proben bereits ein erheblicher Teile des 25-OH-Vitamin-D zersetzt bzw. durch Lichteinwirkung umgelagert hatte.

Beispiel 5: Kontrolle der ELISA-Bestimmung durch HLPC

Es wurden daher in verschiedenen Proben die 25-OH-Vitamin-D-Konzentration durch ELISA gemäß Beispiel 3 und zur Kontrolle durch HPLC nachbestimmt. Für die Eichkurve wurden Standards verwendet mit Vitamin-D₃-Konzentrationen von 0, 8, 20, 50, 125 und 312 nMol/l. Alle Proben und Standards wurden in Doppelwerten bestimmt. Die 25-OH-Vitamin-D₃-Konzentration der Proben wurde dann anhand der Eichkurve aus den Mittel der Doppelwerte berechnet.

Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle VI gezeigt.

20

15

Tabelle VI

Probe	25-OH-Vita	min-D ₃ [nMol/L]
.1000	HPLC	ELISA
1	20-33	30
	72-120	76
	79-102	96
	< 15	< Nachweisgrenze
	< 15	7.4

Beispiel 6: Langzeitstabilität von 25-Hydroxyvitamin-D-Konjugat in der ELISA-Bestimmung.

Es wurden Eichkurven mit gleichen Standardlösungen und Reagenzien gemäß dem Beispiel 3 nach 60 und 100 Tagen wiederholt, um zu ermitteln, inwieweit sich eine ELISA-Bestimmung mit erfindungsgemäßen Biotin-25-OH-Vitamin-D-Konjugat im Laufe der Zeit verändert, wenn die Reagenzien zwischenzeitlich bei 4 bis 6°C im Dunkeln gelagert werden. Die nachstehende Tabelle zeigt die jeweiligen optischen Dichten nach 30 Minuten Entwicklung (siehe Beispiel 3)

10

15

20

5

Tabelle VII

Standard	Standard	Doppelwert zu Spalte 1	Nach 60 Tagen	Doppelwert zu Spalte 3	Nach 100 Tagen	Doppelwert zu Spalte 5
nMol/L	1	2	3	4	5	6
NSB			0.191	0.280	0.088	0.109
	2,256	2,182	2,227	2,285	1,471	1.562
	1.845	1.861	2.041	2.125	1.345	1.366
8	1,043	1.456	1.860	1,903	1.079	1.060
20	0.625	0.612	1.293	1.214	0.610	0.690
50 125	0.023	0.261	0.606	0.615	0.442	0.329
312	0.156	0.176	0,448	0.434	0.293	0.257

Werden die Werte der verschiedenen Eichkurven, abzüglich der jeweiligen nichtspezifischen Bindung, in ein Diagramm aufgetragen (siehe Fig. 5B), so ist leicht ersichtlich, dass die Eichkurven abgesehen einer relativen vertikalen Verschiebung die gleiche Form besitzen. Dies zeigt, dass sich die Empfindlichkeit und Spezifität der ELISA-Bestimmungen über den genannten Zeitraum nicht verändert hat.

Beispiel 7: 25(OH)-Vitamin-D₃-ELISA-MTP mit anti-Vitamin-D-Bindungsprotein

Der Versuch erfolgte im Wesentlichen nach dem Protokoll von Beispiel 3 und dem in Fig. 4 gezeigten Prinzip. Es wurden folgende Puffer verwendet: a) Waschpuffer: PBS, pH 7.4 mit 0.05% Tween-20; b) Assaypuffer: 5 g Casein wurden in 100 ml 0.1 N NaOH gelöst und mit PBS, pH 7,4 auf 1 l aufgefüllt. Dann wurden 3% (w/v) PEG-6000 sowie 0.1 g ThimerosalTM hinzugefügt. Alle Inkubationen erfolgten im Dunkeln und unter Schütteln.

(i) Beschichtung der Mikrotiterplatte

In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 μl Kaninchen-anti-Vitamin-D-Bindungsprotein in 60 mM NaHCO₃, pH 9,6 gegeben und die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Lösungen wurden entfernt und jede Vertiefung fünfmal mit 200 μ l Waschpuffer gewaschen. Dann wurde 250 μ l Assaypuffer in jede Vertiefung gegeben und die Platte eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Assaypuffer wurde entfernt und eine jede Vertiefung fünfmal mit je 200 μ l Waschpuffer gewaschen.

5 (ii) Probenvorbereitung

Es wurde 50 μl Serum, Plasma oder Standard in einem 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 200 μl Ethanol_{abs} (vorgekühlt auf -20 C) gemischt, gevortext und dann 20 Minuten bei -20°C ausgefällt. Die Proben wurden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und im ELISA eingesetzt.

10 (iii) ELISA

15

20

25

30

Als Erstes wurde in eine jede Vertiefung 100 µl Vitamin-D-Bindungsprotein, verdünnt in Assaypuffer, gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Platte ausgeschlagen und eine jede Vertiefung fünfmal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen.

Danach wurden je 100 μ l Biotin-Vitamin-D, verdünnt in Assaypuffer, zusammen mit 10 μ l Standard, Probe oder Kontrolle in die Vertiefungen gegeben. Die Platte wurde 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Lösungen wurden wiederum entfernt und eine jede Vertiefung fünfmal mit je 200 μ l Waschpuffer gewaschen.

Als Drittes wurde jeweils 100 μ l Peroxidase-gekopppeltes Streptavidin einer 1:10000-Verdünnung in Waschpuffer in die Vertiefungen gegeben und 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde ausgeschlagen und jede Vertiefung fünfmal mit je 200 μ l Waschpuffer gewaschen.

Für die Farbreaktion wurden 100 μl TMB-Substrat-Lösung in jede Vertiefung gegeben. Nach ausreichender Farbentwicklung (30 Minuten) wurde die Reaktion mit 50 μl 2M H₂SO₄ pro Vertiefung beendet. Die Messungen der optischen Dichte erfolgte bei 450 nm. Es wurden ähnliche bis gleiche Ergebnisse erhalten, wie in Beispiel 3 bzw. Tabelle V.

Beispiel 8: Inhalt einer Testpackung bzw. eines Reagenziensatzes zur Bestimmung von 25-Hydroxyvitamin-D und 10,25-Dihydroxyvitamin-D:

Inhalt der Testpackung bzw. Testreagenzien und deren Vorbereitung:

Standards, bspw. 6 Fläschchen 25-OH-Vitamin-D-Standards mit den Konzentrationen 0, 8, 20, 50, 125 und 312 nmol/l; gebrauchsfertig in Waschpuffer.

Mikrotiterplatten, bspw. mit Streptavidin beschichtet, steril verpackt und vorgewaschen.

Pufferlösungen, bspw. Waschpuffer, NSB-Puffer und Assaypuffer, Stopplösung.

Kontrollen, bspw. zwei Fläschchen 25-OH-Vitamin-D-Kontrollen in Humanserum. Kontrolle 1 (30 nMol 25-OH-D/L). Kontrolle 2 (80 nMol 25-OH-D/L).

35 Tracer, bspw. ein Fläschchen mit Biotin-Vitamin-D (25-OH-Vitamin-D₃-3β-3'[6-N-(biotinyl)-hexamido]amidopropylether) in Waschpuffer (100 ng/ml)

Vitamin-D-Bindungsprotein, bspw. ein Fläschchen mit Bindungsprotein aus Ziegenserum in Phosphatpuffer mit 0,1% NaN₃ als Stabilisator.

10

15

20

25

30

35

Marker, bspw. ein Fläschchen anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase in Waschpuffer.

TMB-Entwicklerlösung, bspw. ein Fläschchen stabilisierte Tetramethylbenzidin-Entwicklerlösung in Waschpuffer.

Beispiel 9: ELISA zur quantitativen Bestimmung von 1,25-Dihydroxyvitamin-D

Die Bestimmung von 1,25-Vitamin-D₃ erfolgte nach dem in Fig. 2 dargestellten Prinzip, nur dass als Tracer 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D₃-Biotin-Verbindung diente. Bei der Kompetition wird 1,25-Dihydroxyvitamin-D₃ aus Standard oder Probe zusammen mit einem 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Bindungsprotein, einem monoklonalen Maus-anti-1α,25-Dihydroxyvitamin-D-Antikörper (B. Mawer et al. in Steroids, 1985, 46, 741-754), zusammengegeben. Das 1,25-Dihydroxyvitamin-D₃ aus Standard oder Probe und die immobilisierte 1,25-Dihydroxyvitamin-D₃-Biotin-Verbindung konkurrieren dann um die Bindungsstelle des Antikörpers. Der Nachweis erfolgt mittels Peroxidase-markierten Antikörpern (Ziege-anti-Maus-lgG-POX).

- (i) Die Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Streptavidin erfolgte wie in Beispiel 3, wobei aber der Waschpuffer 0.1% TritonTM X-100 als Detergens enthielt. Anders als in Beispiel 3 wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte nach der Behandlung mit der Streptavidin-Lösung nicht mehr mit Waschpuffer gewaschen, sondern jeweils eine Stunde mit 250 μl wässriger Sorbitol-Lösung (KarionTM F 1:4 in Wasser) behandelt. Die Bindung des Tracers (1,25-Dihydroxyvitamin-D-Biotin) erfolgte wie in Beispiel 3, nur dass in jede Vertiefung 200 μl Tracer-Lösung gegeben wurde (20 ng 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-3β-3'[6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether in Waschpuffer). Das 1,25-Dihydroxy-vitamin-D-Biotin wurde wie in Fig. 1 schematisch aufgezeigt synthetisiert, nur dass nach dem ersten Schritt die im Unterschuss 3-cyanoethylierte 1-OH-Vitamin-D-Zwischenverbindung isoliert wurde. Es kann aber auch beliebig eine der nachfolgenden Zwischenverbindungen bzw. nach einer Mischsynthese spezifisch der 1.25-Dihydroxy-Vitamin-D-3β-3'[6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether mittels HPLC isoliert werden.
- (ii) Da im menschlichen Serum das Verhältnis von 25-OH-Vitamin-D₃ zu 1,25-Dihydroxyvitamin-D₃ in der Regel im Bereich von 1000:1 liegt, bedarf die quantitative Bestimmung von 1,25-Dihydroxyvitamin-D einer gründlichen Vorbereitung der Proben durch eine kombinierte Verteilungs- und Adsorptionschromatographie. Im ersten Schritt wurden hierzu ExtrelutTM-Kieselgur-Säulen (Merck, Darmstadt) mit je 500 μl Tris-Puffer äquilibriert und dann auf die Säulen jeweils 500 μl Standard, Kontrolle oder Untersuchungsprobe in Duplikaten aufgetragen; die Proben konnten dann 10 Minuten auf den Säulen einziehen. Die Abtrennung der Vitamin-D-Verbindungen von der ExtrelutTM-Säule erfolgte durch 4 mal 1 ml Diisopropylether im Abstand von jeweils drei Minuten. Der ExtrelutTM-Extrakt wurde unmittelbar auf eine Silica-Kartusche (Merck, Darmstadt) überführt und die ExtrelutTM-Säule verworfen. Die Silicasäule wurde 5 mal mit 2 ml Isopropanol/Hexan (4/96 v/v) und 3 mal mit 2 ml Isopropanol/Hexan (6/94 (v/v)) gewaschen. Das 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D wurde dann mit 2 mal 2 ml Isopropanol/Hexan (25/75 v/v) von der Silicasäule eluiert und unter Stickstoffstrom bei 37°C oder in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Standard- und Untersuchungsproben wurden schließlich in 20 μl Ethanol p.a. aufgenommen, mit je 200 μl Maus-anti-1,25-Dihydroxyvitamin-D-Antikörperlösung (1: 150000 in RRA-Assaypuffer: 50 mM KH₂PO₄, 15 mM KCl, 1,25 mM EDTA,

10

15

3mM Mercaptoethanol, pH 7,5) versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert – möglichst zeitgleich mit der Belegung der Streptavidin-behandelten Mikrotiterplatte mit dem 1,25-Dihydroxy-vitamin-D-Biotin-Tracer.

(iii) Die Vertiefungen der Tracer-beschichteten Mikrotiterplatte wurden 5 mal mit je 300 μl TritonTM-Waschpuffer gewaschen und auf saugfähigem Papier ausgeschlagen. Dann wurde 200 μl Antikörper-Probenlösung aus der Vorinkubation in die Vertiefungen überführt und eine Stunde im Dunkeln und unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Entfernen der Lösungen aus den Vertiefungen wurden diese fünfmal mit je 200 μl Waschpuffer gewaschen. Die quantitative Bestimmung erfolgte analog Beispiel 3 durch eine Stunde Inkubation mit 200 μl Kaninchen-anti-Maus-IgG-Peroxidase (1:10000 in Waschpuffer) bei Raumtemperatur, fünfmal Waschen der Vertiefungen mit 300 μl Waschpuffer, eine Farbreaktion im Dunkeln mit 200 μl TMB-Substratlösung (gebrauchsfertig von NOVUM Diagnostika GmbH, Dietzenbach) , Stoppen der Farbreaktion nach 15 Minuten durch Zugabe von 50 μl 2 M H₂SO₄ und Bestimmen der Extinktion bei 450 nm.

Die nachstehende Tabelle VIII zeigt die Ergebnisse der 1,25-Dihydroxyvitamin-D-Bestimmung im Serum von 11 Dialysepatienten und sechs willkürlich ausgewählten Normalpersonen. Zur Ermittlung der Eichkurve bzw. als Standard wurden Lösungen von 1,25-Dihydroxyvitamin-D in Assaypuffer mit folgenden Konzentrationen eingesetzt: 0, 6,6, 20, 60 und 180 pg/ml (siehe Eichkurve in Fig. 5C).

Tabelle VIII

Pipettier Schema	Standard 1.25-OH-Vit.D	Anmerkungen	OD 450 nm	Doppel- wert	Mittelwert	Standard- Abweichung
Schema	pg /ml		120			
i	0		0,784	0.781	0.782	0,002
2	6.6	Eichkurve	0.732	0.741	0,737	0.006
3	20	Siehe Fig. 5C	0,628		0.628	_
4	60	1	0,484		0.484	
5	180	1	0,233		0.233	
Kontroll- Serum 98-08-295	50,1	Sollbereich: 23-63 pg/ml Mittel: 43.21 pg/ml S.D.: 6,62 pg/ml	0,493			
Proben-	Messwert					
Nummer	[pg/ ml]					
1	6,5		0.705	0.733	0.719	0.020
2	39.1	Serumproben von	0.564	0,508	0.536	0.040
3	57.8	Dialy sepatienten	0,475	0.458	0.466	0,012
4	12,2	71	0,672	0,687	0.679	0.010
5	0.3	Mittelwert: 20.5	0,776	0,774	0,775	0,002
6	4,0	S.D 17.2	0,667	0,816 .	0.741	0,105
7	13.4	Median 13,4	0,642	0.700	0.671	0.041
8	39,4	1	0,565	0.504	0.535	0,043
9	22.1	11	0,619	0,618	0.000	
10	22.6	1 i	0.531	0.700	0.616	0,119
11	8.6	7)	0,705		0.705	
Vergleichs- proben						
1	52.9	Serumproben von	0.502	0.464	0.483	0.027
2	42.6	Normalpersonen	0.518	0.525	0.522	0,005
3	35.3	11	0,522	0,583	0.553	0.043
4	32.9	Mittelwert 46.0	0.571	0.556	0.563	0,010
5	59.2	S.D. 9.7	0,410	0.514	0.462	0.073
6	53.1	Median 47.8	0.485	0.480	0.482	0,003

Fig. 14 veranschaulicht in einem Balkendiagramm nochmals die gefundenen Werte für Dialyse- und Normalpatienten, wonach das Serum von Dialysepatienten im Schnitt deutlich weniger aktives 1,25-Dihydroxyvitamin-D enthält. Die große Varianz der Werte bei den Dialysepatienten zeigt zudem die Notwendigkeit, bei Dialysepatienten den Gehalt an aktiviertem 1,25-Dihydroxyvitamin-D im Serum noch verstärkt zu kontrollieren, um den typischen Folgen eines Vitamin-D-Mangels besser entgegentreten zu können.

BNSDOCID: <WO_____9967211A1_f_>

PATENTANSPRÜCHE

1. Vitamin-D-Derivat der Formel:

5

10

15 worin ist:

O das Sauerstoffatom einer Ethergruppe;

X eine substituierte oder unsubstituierte Kohlenwasserstoffstoffgruppe von 0,8 bis 4,2 nm Länge, die übliche Heteroatome wie S, O, N oder P aufweisen kann

Y Wasserstoff oder Hydroxy;

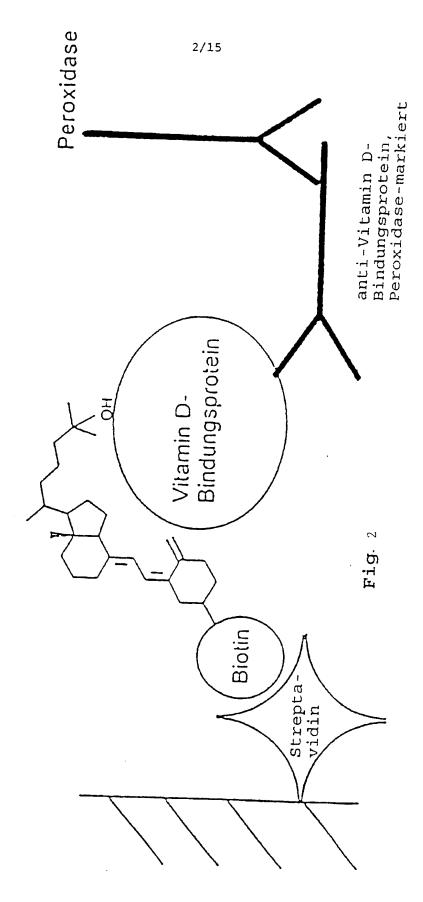
20 A eine Tracer-Gruppe, die von einem bindenden Protein mit hoher Affinität gebunden werden kann;

R eine substituierte oder unsubstituierte Kohlenwasserstoff-Seitengruppe von Vitamin-D oder eines Vitamin-D-Metabolits, eine Seitengruppe von Vitamin-D₂ oder D₃, die 25-OH-Seitengruppe von Vitamin-D₂ oder -D₃.

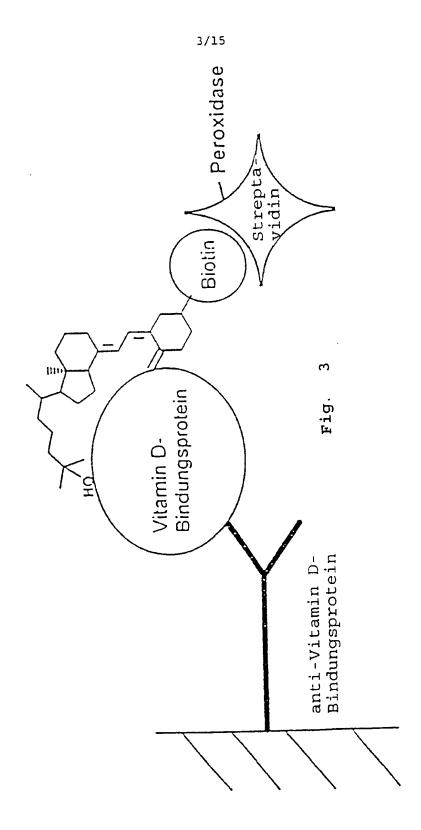
- 2. Vitamin-D-Derivat nach Anspruch 1, wobei A ausgewählt ist aus Biotin, Digoxigenin, Tyrosin, FITC substituiertem Tyrosin, substituierten Aminosäuren, charakteristischen Aminosäure- und Peptidsequenzen, FITC, Proteinen und Peptidgruppen, Protein A, Protein G, Vitamin-D-Derivaten, 25-OH-Vitamin-D.
- 30 3. Vitamin-D-Derivat nach Anspruch 1, wobei A eine Verbindung ist der Formel (I), welche in der 3β-Stellung über eine Etherbrücke mit der Abstandsgruppe X verbunden ist.
 - 4. Vitamin-D-Derivat nach irgendeinem Anspruch 1 bis 3, wobei die Abstandsgruppe eine Länge von 0,8 bis 2 nm, besonders bevorzugt 0,9 bis 1,5 nm.
- 5. Vitamin-D-Derivat nach irgendeinem Anspruch 1 bis 4, wobei die Abstandsgruppe eine Aminocarbonsäure-, ein Aminoundecansäure- oder ein Aminopolyetherrest ist.

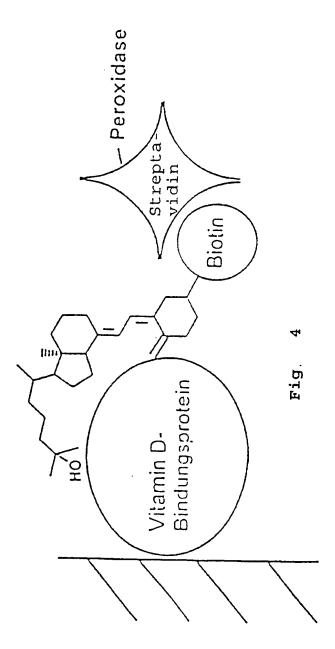
- 6. Verfahren zur Herstellung eines Vitamin-D-Derivats nach irgendeinem Anspruch 1 bis 5, umfassend die Schritte: a) Cyanoethylierung von 25-Hydroxyvitamin-D mit Acrylnitril in einem Gemisch mit Acetonitril, Kaliumhydrid und tert-Butanol und b) Reduktion der Nitrilgruppe mit LiH/LiAlH₄.
- Verfahren zur quantitativen Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1α,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Metabolit in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, dass ein Vitamin-D-Derivat nach irgendeinem Anspruch 1 bis 5 als Bindungspartner eingesetzt wird.
 - 8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Verfahren eine Proteinbindungsanalyse umfasst.
 - 9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das Verfahren die Bindung an einen Rezeptor umfasst.
- 10 10. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das Verfahren eine Bindung an einen Antikörper umfasst.
 - 11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das Verfahren ein kompetitiver Immunoassay ist, ausgewählt aus RIA, EIA/ELISA, LiA und FiA.
- 12. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das Verfahren ein Sandwich-Immunoassay ist, ausgewählt aus IRMA, IEMA/EUA, ILMA (Immunolumineszenzassay) und IFMA (Immunofluoreszenzassay).
 - 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 12, umfassend eine feste Phase, ausgewählt aus Mikrotiterplatte und anderen festen Trägern, Mikropartikel, bevorzugt aus Agarose, polymerem Material, Cellulose, magnetische Mikropartikel.
- Verfahren nach einem Anspruch 7 bis 13, wobei das Verfahren automatisierbar in Flüssigoder Festphase erfolgt.
 - Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1α,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Metaboliten nach irgendeinem Anspruch 7 bis 14, umfassend die Schritte: a) Beschichten eines festen Trägers mit Streptavidin: b) Zugabe von Biotin-Vitamin-D-Derivat nach irgendeinem Anspruch 1 bis 5; c) Zugabe der Probe und einer definierten Menge Vitamin-D-bindendes Protein; d) Bestimmung des gebundenen Bindungsproteins mit markierten Antikörpern gegen Vitamin-D-bindendes Protein.
- Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1α,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Metaboliten nach irgendeinem Anspruch 7 bis 14, umfassend die Schritte: a) Beschichten eines Trägers mit Antikörpern gegen Vitamin-D-bindendes Protein; b) Zugabe von Vitamin-D-bindendes Protein; c) Zugabe der Probe sowie einer definierten Menge Biotin-gekoppeltes Vitamin-D-Derivat nach Anspruch 1; d) Bestimmung der Menge gebundenes Derivat mit markiertem Streptavidin.

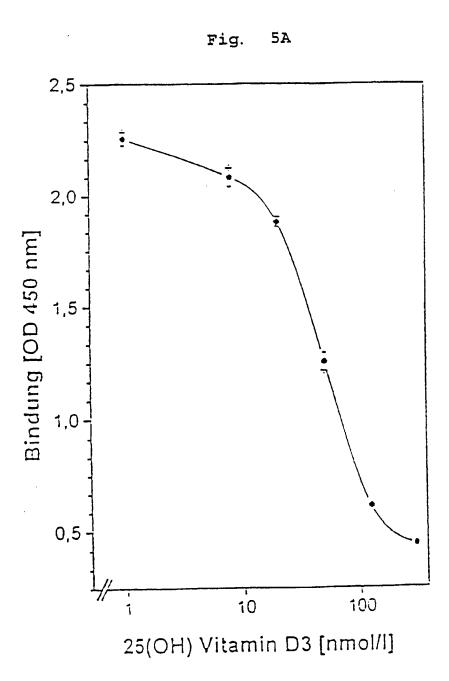
- 17. Verfahren nach irgendeinem Anspruch 7 bis 16, wobei die Bestimmung erfolgt durch Markierung mit einem Enzym, das eine Nachweisreaktion katalysiert.
- 18. Reagenziensatz zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1α,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Metaboliten nach einem Verfahren gemäß irgendeinem Anspruch 7 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass er eine standardisierte Menge Feststoff oder Lösung eines Vitamin-D-Derivats gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 aufweist.



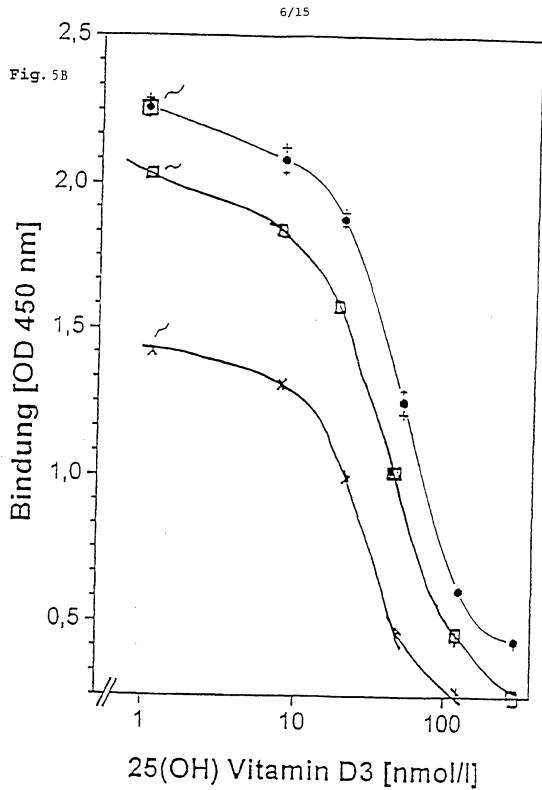
ERSATZBLATT (REGEL 26)

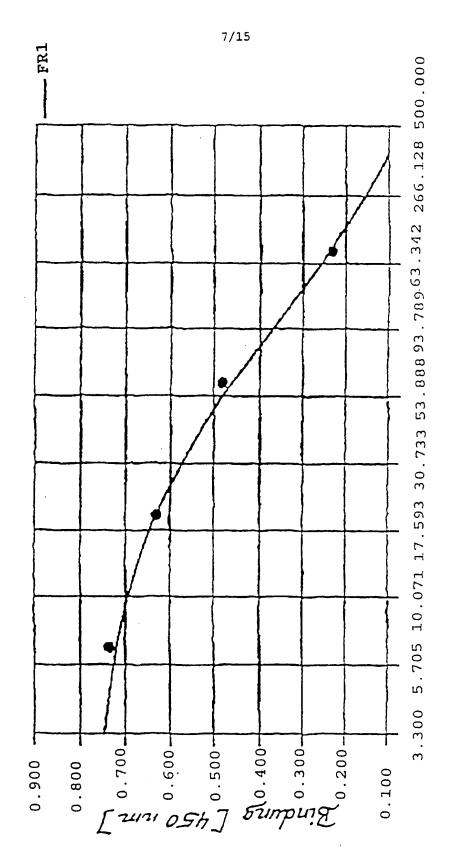






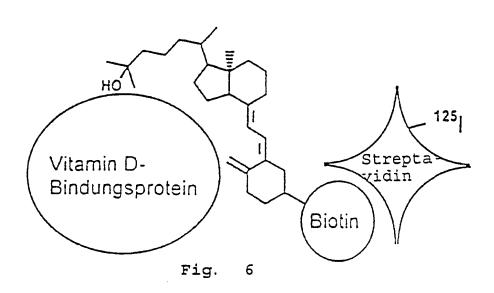
ERSATZBLATT (REGEL 26)





1,25 Dihydroxyvitamin D [pg/ml] Fig. 50

ERSATZBLATT (REGEL 26)



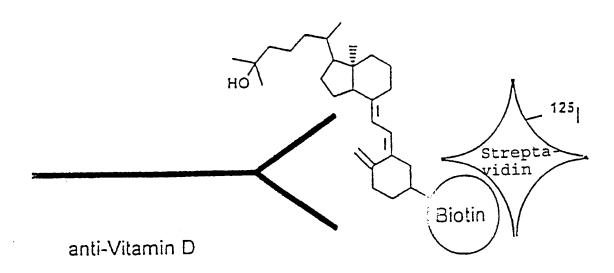
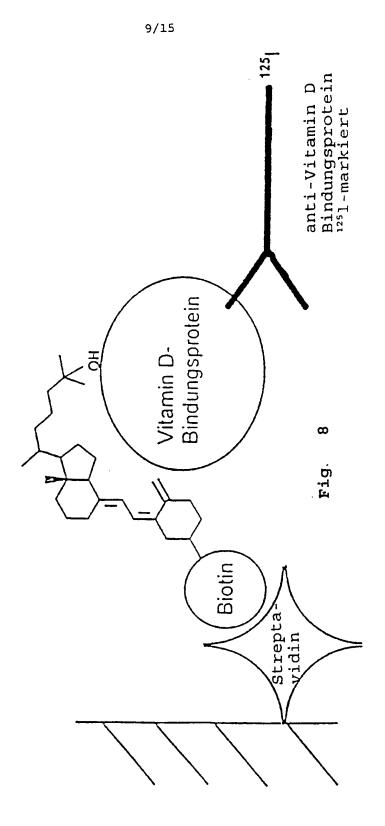
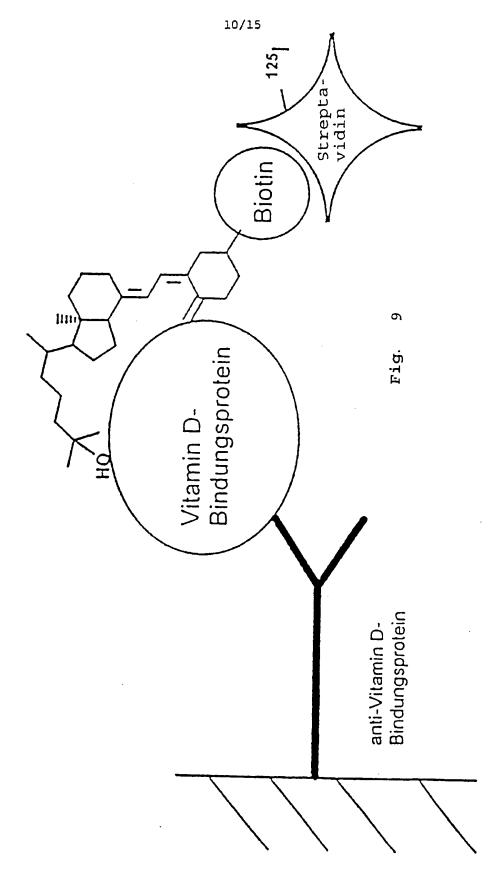


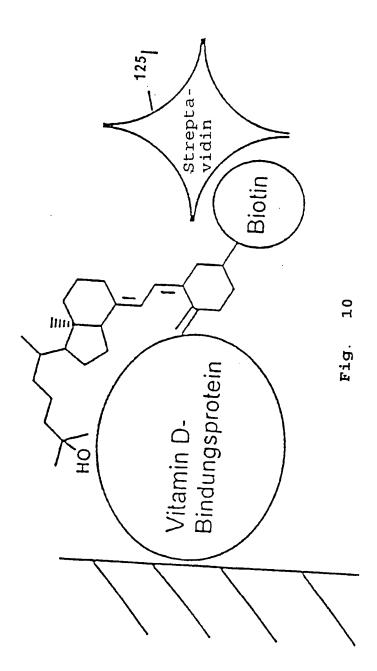
Fig. 7

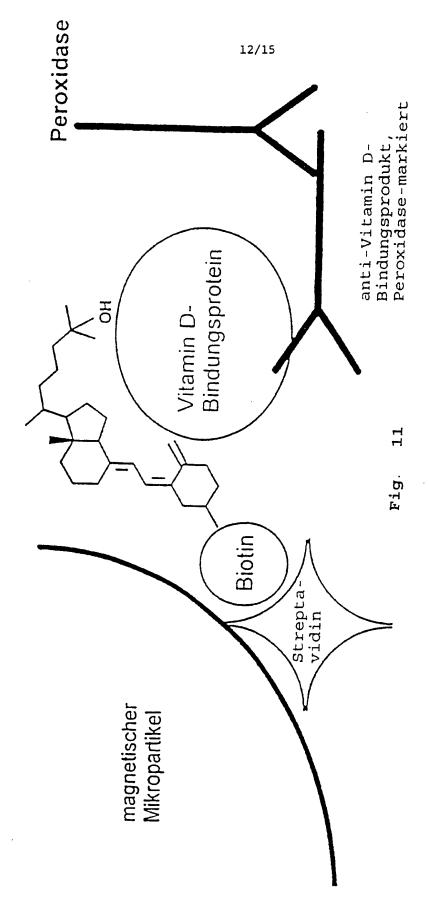


ERSATZBLATT (REGEL 26)

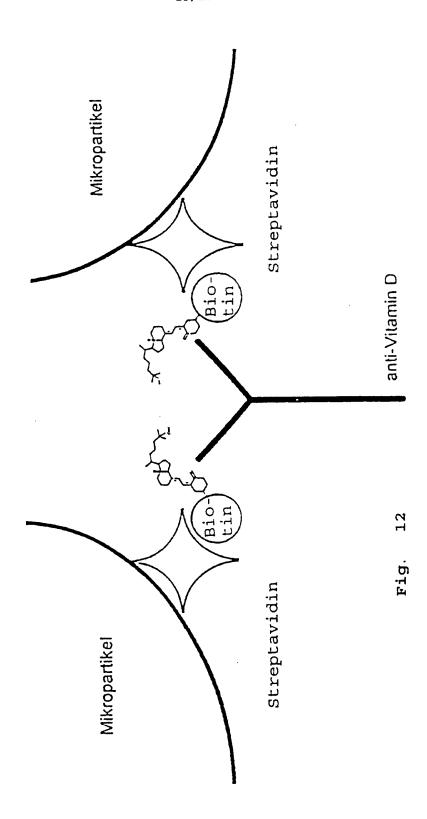


ERSATZBLATT (REGEL 26)

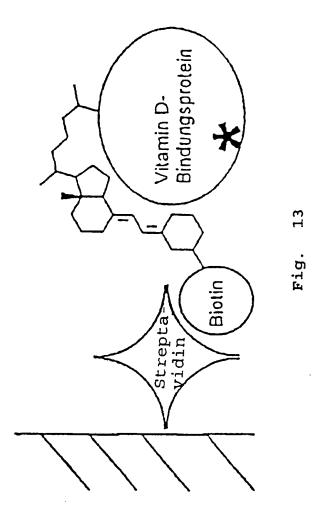


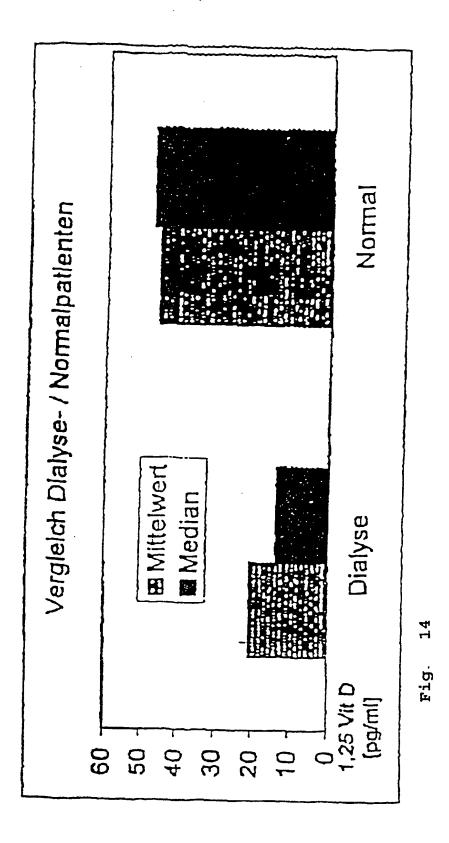


ERSATZBLATT (REGEL 26)



ERSATZBLATT (REGEL 26)





ERSATZBLATT (REGEL 26)

BNSDOCID: <WO_____9967211A1_I_>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern nat Application No PCT/EP 99/04418

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER			
IPC 6	C07C401/00		
According	to International Patent Classification (IPC) or to both national classif	ication and IPC	
B. FIELDS SEARCHED			
IPC 6	documentation searched (classification system followed by classifica C07C	ation symbols)	
	ation searched other than minimum documentation to the extent that		
Electronic	data base consulted during the international search (name of data b	base and, where practical, search terms used)
C. DOCUM	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Relevant to claim No.
Х	WO 97 24127 A (A AND D ASSAY INC ;RAY RAHUL (US); HOLICK MICHAEL F (US)) 10 July 1997 (1997-07-10) examples 1-3,5,9		1-18
х	KOBAYASHI, N. ET AL.: "Specificity of Polyclonal Antibodies Raised against a Novel 24,25-Dihydroxyvitamin D3-Bovine Serum Albumin Conjugant Linked through the C-11-alpha or C-3 Position" J. STEROID BIOCHEM. MOLEC. BIOL., vol. 62, no. 1, 1997, pages 79-87, XP002119849 page 82, column 1, line 1-30		1,2,5, 7-11,13, 18
		-/	
Y Further documents are listed in the continuation of box C.			
*Special categories of cited documents: "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the			
"E" earlier document but published on or after the international filing date "X" document of particular relevance; the claimed invention			aimed invention
which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone document or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone document is taken alone or "Y" document of particular relevance; the claimed inventive step when the document is taken alone or "Y" document is combined with one or more other such as the claimed inventive step when the document is taken alone or "Y" document is combined with one or more other such as the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone or "Y" document is combined with one or more other such as the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such as the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone or "Y" document is combined with one or more other such as the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone or "Y" document is combined with one or more other such as the claimed invention cannot be considered to inventive step when the document is taken alone or "Y" document is combined with one or more other such as the claimed invention cannot be considered to involve an invention cannot be considered to inven			ument is taken alone aimed invention antive step when the e other such docu-
"P" document published prior to the international filing date but		ments, such combination being obvious to a person skilled in the art. &" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search Date of mailing of the international search report			
21 October 1999		10/11/1999	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk		Authorized officer	
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo ni, Fax: (+31-70) 340-3016		Janus, S	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)